



DETERMINACIÓN DE LA ENANTIOSELECTIVIDAD DE LIPASAS EMPLEANDO UN NUEVO MÉTODO DE ANÁLISIS.

Juan Carlos Mateos¹, Orfil González², Jesús Cordova² y Jacques Baratti¹

¹Groupe de Biocatalyse et Chimie Fine, Université de la Méditerranée, Marseille, Francia.

²Depto. de Ing. Química, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, México.

jesuscordovaudg@yahoo.com.mx

Palabras clave: método de análisis, lipasas, biocatálisis

Introducción. Las lipasas son los biocatalizadores más importantes debido a la gran variedad de reacciones que son capaces de catalizar. Estas enzimas catalizan, tanto la hidrólisis como la síntesis de una gran variedad de ésteres carboxílicos, con una exquisita enantioselectividad, siendo esta cualidad muy deseable para su aplicación en química orgánica, en particular para la síntesis de fármacos. La selección de una adecuada lipasa para un proceso dado, es la etapa más ardua y difícil; puesto que los productos de las reacciones son analizadas por HPLC, GC o NMR, que en el mejor de los casos, cada determinación toma al menos 4h.¹ Para agilizar esta etapa, es imprescindible contar con un método de análisis rápido, sencillo y económico.

El objetivo del presente trabajo fue de proponer un método con las características anteriormente señaladas, siendo usado para determinar la enantioselectividad de diez extractos enzimáticos crudos obtenidos por cultivo de hongos termófilos y de veinte lipasas comerciales.

Metodología. Las soluciones de sustratos fueron preparadas al mezclar 500 µl de cada enantiómero de butirato de glicidilo (100 mM, disuelto en acetonitrilo, conteniendo 10 mM de *p*-nitrophenol como indicador de pH), 500 µl de acetato o butirato de resorufina como un compuesto de referencia (1 mM, disuelto en acetonitrilo) y 9 ml de BES 2.5 mM, pH 7.2. En cada pozo de microplaca, fueron agregados 20 µl de cada solución de enzima a una apropiada dilución (en BES 2.5 mM, pH 7.2) y 100 µl de la solución de sustrato. La placa fue colocada en un lector de microplacas, monitoreando simultáneamente la disminución en absorbancia para el *p*-nitrophenol (a 410 nm) y el aumento en absorbancia para la resorufina (a 570 nm). Los datos fueron colectados cada 25 s, por triplicado, durante 20 min a 25°C, calculando las velocidades de reacción.²

Resultados y discusión. Un nuevo método fue adaptado para determinar rápida y fácilmente la enantioselectividad de extractos enzimáticos crudos y de lipasas comerciales de diferentes fuentes biológicas. El método consistió básicamente en la medición espectrofotométrica de la protonación de los aniones de *p*-nitrofenolato y de la liberación de la resorufina. La enantioselectividad fue calculada usando las velocidades de reacción de la hidrólisis de los enantiómeros de butirato de glicidilo, en competición con ésteres de resorufina. Este análisis permitió la cuantificación simultánea de la enantioselectividad en 96 reacciones, en menos de 30 min.

El método propuesto fue aplicado a diez extractos enzimáticos crudos provenientes del cultivo de hongos

termófilos; así como, a veinte lipasas comerciales de bacterias, hongos y de mamíferos (Cuadro 1). A excepción de la lipasa de *C. antarctica* B, todas las lipasas ensayadas hidrolizaron preferentemente el enantiómero *S*. Este método permitió la determinación precisa del coeficiente enantiomérico (*E*), puesto que los valores obtenidos concordaron con los valores de *E* determinados por métodos químicos clásicos (GC).

Cuadro 1. Enantioselectividad (*E*) de lipasas de hongos termófilos y de lipasas comerciales para los enantiómeros *R* y *S* del butirato de glicidilo.

Lipasas de hongos termófilos		Lipasas fúngicas (comerciales)	
	<i>E</i>		<i>E</i>
<i>cepa</i>		<i>Rh. oryzae</i>	3.7 (<i>S</i>)
8a	2.5 (<i>S</i>)	<i>Rh. delemar</i>	3.7 (<i>S</i>)
19	2.5 (<i>S</i>)	<i>M. javanicus</i>	5.4 (<i>S</i>)
56c	3.0 (<i>S</i>)	<i>H. lanuginosa</i>	3.4 (<i>S</i>)
13b	2.5 (<i>S</i>)	<i>A. niger</i>	1.4 (<i>S</i>)
43a	2.3 (<i>S</i>)	<i>P. camembertii</i>	1.3 (<i>S</i>)
25c	1.1 (<i>S</i>)	<i>P. simplicissimum</i>	1.0 (<i>S</i>)
42c	1.1 (<i>S</i>)	<i>C. rugosa</i>	2.5 (<i>S</i>)
23a	1.1 (<i>S</i>)	<i>C. antarctica A</i>	1.3 (<i>S</i>)
9a	1.1 (<i>S</i>)	<i>C. antarctica B</i>	3.8 (<i>R</i>)
13a	5.5 (<i>S</i>)	<i>F. solani</i>	1.3 (<i>S</i>)
		<i>Rh. homothallicus</i>	5.8 (<i>S</i>)
Lipasas mamíferos		Lipasas bacterianas	
	<i>E</i>		<i>E</i>
<i>Humano</i>	12.4 (<i>S</i>)	<i>P. cepacia</i>	3.6 (<i>S</i>)
<i>Perro</i>	4.7 (<i>S</i>)	<i>P. glumae</i>	1.4 (<i>S</i>)
<i>Cerdo</i>	11 (<i>S</i>)	<i>P. fluorescens</i>	2.6 (<i>S</i>)
<i>Caballo</i>	4.2 (<i>S</i>)		
<i>Rata</i>	5.9 (<i>S</i>)		

La letra *S* o *R* indica el enantiómero que es preferentemente hidrolizado.

Conclusiones. Este método puede ser aplicado para la determinación simultánea de la enantioselectividad de numerosas muestras enzimáticas provenientes de fuentes biológicas silvestres o de variantes de proteínas generadas por evolución dirigida, usando directamente en el ensayo, el sustrato (i.e. ésteres) de interés para un proceso dado.

Bibliografía.

- Kazlauskas, R., Janes, L., Löwendahl, C. (1998). Quantitative screening of hydrolase libraries using pH indicators: Identifying active and enantioselective hydrolases. *Chem. Eur. J.* 11: 2324-2331.
- Kazlauskas, R., Man Fai Liu, A., Somers, N. (2001). Mapping de substrate selectivity of new hydrolases using colorimetric screening. *Tetrahedron:Asymmetry.* 12: 545-556.